

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003年6月12日 (12.06.2003)

PCT

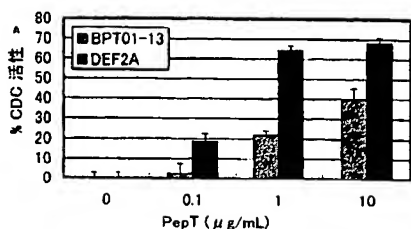
(10) 国際公開番号
WO 03/047621 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 39/395, A61P 35/00, 43/00, C07K 16/18, C12P 21/08
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/12708
- (22) 国際出願日: 2002年12月4日 (04.12.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2001-369608 2001年12月4日 (04.12.2001) JP
特願2002-164834 2002年6月5日 (05.06.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 児玉 龍彦 (KODAMA, Tatsuhiko) [JP/JP]; 〒154-0002 東京都世田谷区下馬4丁目16番5号 Tokyo (JP). 浜窪 隆雄 (HAMAKUBO, Takao) [JP/JP]; 〒201-0005 東京都狛江市岩戸南3丁目6番27号 Tokyo (JP). 齋藤 良一 (SAITOH, Ryoichi) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 大泉 敏雄 (OHIZUMI, Iwao) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).
- (74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,

[続葉有]

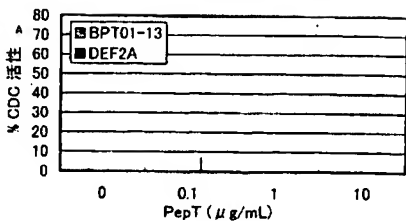
(54) Title: CELL PROLIFERATION INHIBITOR CONTAINING ANTI-PepT ANTIBODY

(54) 発明の名称: 抗PepT抗体を含有する細胞増殖抑制剤



(57) Abstract: As the results of extensive studies, it is found out that an antibody binding to PepT has a cytotoxic activity and inhibits cell proliferation. These results indicate that the antibody binding to PepT, in particular, the cytotoxic antibody, is useful as a cell proliferation inhibitor in, for example, treating and preventing cancer.

(57) 要約:



A. % CDC ACTIVITY

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、PepTに結合する抗体が細胞傷害活性を有すること、さらに、細胞増殖を抑制することを見出した。この結果から、PepTに結合する抗体、特に細胞傷害活性を有する抗体は細胞増殖抑制剤として、例えば癌の治療や予防への利用が可能である。



ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

抗PepT抗体を含有する細胞増殖抑制剤

技術分野

本発明は、PepTに結合する抗体および該抗体を有効成分として含有する細胞増殖抑制剤に関する。

背景技術

哺乳動物は、生体外から栄養源を取り込む必要性があり、細胞には多くの輸送タンパク質が存在することが知られている。ペプチドの輸送を行っているのはペプチドトランスポーター（ペプチド輸送タンパク質；PepT）であり、現在までに多数のPepTが見出されている（J.Biol.Chem., 1995, 270(12), 6456-6463.、Biochim.Biophys.Acta., 1995, 1235, 461-466.、Mol. Microbiol., 1995, 16, 825.、特開平6-261761、特開平11-172、US5849525など）。PepTはペプチドの細胞内への流入を行うタンパク質と細胞外への流出を行うタンパク質に分けられる。又、輸送の際に利用するエネルギー源の違いによっても分類することができ、細胞内外のプロトンの濃度差を利用して輸送を行うプロトン駆動型PepTは、PTRファミリーに属する（Mol. Microbiol., 1995, 16, 825.）。一方生体内のATPを使用して輸送を行うPepTはABCファミリーに属する（Annu. Rev. Cell. Biol., 1992, 18, 67.）。

PepTはジペプチド、トリペプチドなどの小分子ペプチドだけでなく、 β -ラクタム抗生物質、ACE阻害剤などの薬剤の輸送にも関与していることが報告されている（Ganapathy, Leibach., Curr. Biol., 1991, 3, 695-701.、Nakashima, et al., Biochem. Pharm., 1984, 33, 3345-3352.、Friedman, Amidon., Pharm. Res., 1989, 6, 1043-1047.、Okano, et al., J. Biol. Chem, 1986, 261, 14130-14134.、Muranushi, et al., Pharm. Res., 1989, 6, 308-312.、Friedman, Amidon., J.

- 2 -

Control. Rel., 1990, 13, 141-146.)。

PepT1およびPepT2は小分子ペプチドを細胞内に取り込むことによりタンパク質の吸収やペプチド性窒素源の維持に寄与しているプロトン駆動型PepTであり、PepT1およびPepT2はそれぞれアミノ酸708個、729個からなる12回膜貫通型タンパク質である(J.Biol.Chem., 1995, 270(12), 6456-6463.、Biochim.Biophys.Acta., 1995, 1235, 461-466.、Terada, Inui, Tanpakusitsu Kakusan Kouso., 2001, 46, 5)。

PepT1およびPepT2も β -ラクタム抗生物質やベスタチンなどの薬物を輸送することが報告されている(Saito, H. et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1995, 275, 1631-1637.、Saito, H. et al., Biochim. Biophys. Acta, 1996, 1280, 173-177.、Terada, T. et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1997, 281, 1415-1421.)。

PepT1は主に小腸で発現し、腎臓、膵臓での発現も確認されている。PepT2は腎臓、脳、肺、脾臓での発現が確認されている。PepT1およびPepT2は小腸や腎尿管上皮細胞の刷子縁膜に局在していることが報告されている(Ogihara, H. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1996, 220, 848-852.、Takahashi, K. et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1998, 286, 1037-1042.、Hong, S. et al., Am. J. Physiol. Renal. Physiol., 1999, 276, F658-F665.、Terada, Inui, Tanpakusitsu Kakusan Kouso., 2001, 46, 5.)。

また、ヒト膵管癌株でPepT1が細胞膜に高発現していること(Cancer Res., 1998, 58, 519-525.)、およびPepT2のmRNAがヒト膵管癌株で発現していること

(Millennium World Congress of Pharmaceutical Sciences, (2000))が報告されている。しかしながら、PepT1およびPepT2の癌細胞増殖への関与は不明であり、PepT1およびPepT2を抗体の標的抗原とすることにより癌細胞の増殖に影響を与えるか否かの議論は行われていなかった。

発明の開示

- 3 -

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、細胞増殖の抑制に有効なPepTに結合する抗体を提供することにある。さらに、本発明は、該抗体を有効成分として含有する細胞増殖抑制剤を提供することをも目的とする。

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、PepTに結合する抗体が細胞傷害活性を有すること、さらに、細胞増殖を抑制することを見出した。この結果から、PepTに結合する抗体、特に細胞傷害活性を有する抗体は細胞増殖抑制剤としての利用が可能である。

即ち、本発明は、

- 〔１〕PepTに結合する抗体を有効成分として含有する細胞増殖抑制剤、
- 〔２〕PepTに結合する抗体が細胞障害活性を有する抗体である、〔１〕に記載の細胞増殖抑制剤、
- 〔３〕細胞傷害活性が抗体依存性細胞性細胞傷害活性（ADCC活性）である、〔２〕に記載の細胞増殖抑制剤、
- 〔４〕細胞傷害活性が補体依存性細胞傷害活性（CDC活性）である、〔２〕に記載の細胞増殖抑制剤、
- 〔５〕PepTがPepT1である、〔１〕～〔４〕のいずれかに記載の細胞増殖抑制剤、
- 〔６〕癌細胞の増殖を抑制する、〔１〕～〔５〕のいずれかに記載の細胞増殖抑制剤、
- 〔７〕癌細胞が膵臓癌である、〔６〕に記載の細胞増殖抑制剤、
- 〔８〕PepTに結合する抗体を投与することを特徴とする、細胞に障害を引き起こす方法、
- 〔９〕PepTに結合し、かつ細胞障害活性を有する抗体、
- 〔１０〕細胞傷害活性が抗体依存性細胞性細胞傷害活性（ADCC活性）である、〔９〕に記載の抗体、
- 〔１１〕細胞傷害活性が補体依存性細胞傷害活性（CDC活性）である、〔９〕に記載の抗体、

- 4 -

〔 1 2 〕 PepTの細胞外領域に特異的に結合する、〔 9 〕に記載の抗体。

〔 1 3 〕 PepTがヒト由来である。〔 9 〕に記載の抗体。

〔 1 4 〕 PepTがPepT1である、〔 9 〕～〔 1 3 〕のいずれかに記載の抗体、を提供するものである。

本発明は、まず、PepTに結合する抗体を有効成分として含有する細胞増殖抑制剤を提供する。

本発明において、「PepTに結合する抗体を有効成分として含有する」とは、抗PepT抗体を主要な活性成分として含むという意味であり、抗PepT抗体の含有率を制限するものではない。

本発明の細胞増殖抑制剤に含有される抗体はPepTと結合する限り特に制限はない。一つの好ましい態様は、PepTと特異的に結合する抗体である。他の好ましい態様は、細胞障害活性を有する抗体である。

本発明における細胞障害活性とは、例えば抗体依存性細胞介在性細胞障害 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity : ADCC) 活性、補体依存性細胞障害 (complement-dependent cytotoxicity : CDC) 活性などを挙げることができる。本発明において、CDC活性とは補体系による細胞障害活性を意味し、ADCC活性とは標的細胞の細胞表面抗原に特異的抗体が付着した際、そのFc部分にFc γ 受容体保有細胞（免疫細胞等）がFc γ 受容体を介して結合し、標的細胞に障害を与える活性を意味する。

抗PepT抗体がADCC活性を有するか否か、又はCDC活性を有するか否かは公知の方法により測定することができる（例えば、Current protocols in Immunology, Chapter7. Immunologic studies in humans, Editor, John E, Coligan et al., John Wiley & Sons, Inc.,(1993)等）。

具体的には、まず、エフェクター細胞、補体溶液、標的細胞の調製を行う。

（ 1 ） エフェクター細胞の調製

CBA/Nマウスなどから脾臓を摘出し、RPMI1640培地(GIBCO社製)中で脾臓細胞を

- 5 -

分離する。10%ウシ胎児血清(FBS、HyClone社製)を含む同培地で洗浄後、細胞濃度を $5 \times 10^6/\text{ml}$ に調製し、エフェクター細胞を調製する。

(2) 補体溶液の調製

Baby Rabbit Complement(CEDARLANE社製)を10% FBS含有培地(GIBCO社製)にて10倍希釈し、補体溶液を調製する。

(3) 標的細胞の調製

膵臓癌細胞株(AsPC-1、Capan-2等)を0.2mCiの ^{51}Cr -sodium chromate(Amersham Pharmacia Biotech社製)とともに、10% FBS含有DMEM培地中で37°Cにて1時間培養することにより放射性標識する。放射性標識後、細胞を10% FBS含有RPMI1640培地にて3回洗浄し、細胞濃度を $2 \times 10^5/\text{ml}$ に調製して、標的細胞を調製する。

次いで、ADCC活性、又はCDC活性の測定を行う。ADCC活性の測定の場合は、96ウェルU底プレート(Beckton Dickinson社製)に、標的細胞と、抗PepT抗体を50 μl ずつ加え、氷上にて15分間反応させる。その後、エフェクター細胞100 μl を加え、炭酸ガスインキュベーター内で4時間培養する。抗体の終濃度は0または10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とする。培養後、100 μl の上清を回収し、ガンマカウンター(COBRA II AUTO-GMMA、MODEL D5005、Packard Instrument Company社製)で放射活性を測定する。細胞障害活性(%)は $(A-C)/(B-C) \times 100$ により求めることができる。Aは各試料における放射活性(cpm)、Bは1% NP-40(半井社製)を加えた試料における放射活性(cpm)、Cは標的細胞のみを含む試料の放射活性(cpm)を示す。

一方、CDC活性の測定の場合は、96ウェル平底プレート(Becton Dickinson社製)に、標的細胞と、抗PepT抗体を50 μl ずつ加え、氷上にて15分間反応させる。その後、補体溶液100 μl を加え、炭酸ガスインキュベーター内で4時間培養する。抗体の終濃度は0または3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とする。培養後、100 μl の上清を回収し、ガンマカウンターで放射活性を測定する。細胞障害活性はADCC活性の測定と同様にして求めることができる。

本発明の細胞増殖抑制剤に含有される抗体は、抗原と結合する限り特に制限は

- 6 -

なく、マウス抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、ヒツジ抗体、キメラ抗体、ヒト型化抗体、ヒト抗体等を適宜用いることができる。抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよいが、均質な抗体を安定に生産できる点でモノクローナル抗体が好ましい。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体は当業者に周知の方法により作製することができる。

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、所望の抗原や所望の抗原を発現する細胞を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞（ハイブリドーマ）をスクリーニングすることによって作製できる。

感作抗原としては特に限定されないが、例えば、PepTがヒトPepT1の場合、ヒトPepT1蛋白質やヒトPepT1を発現する細胞、ヒトPepT1の部分ペプチド（例えば、ndlt dhnhdgtpds、sspgspvtavtddfkq、tddfkqqrht、apnhyqvvdglnqkpe、kdglnqkpekgeng、scpevkvfedisant、ksnpyfmsgansqkq等）などを用いることができる。

抗原の調製は、例えば、バキュロウイルスを用いた方法（例えば、W098/46777など）などに準じて行うことができる。

ハイブリドーマの作製は、たとえば、ミルステインらの方法（Kohler, G., and Milstein, C., *Methods Enzymol.* 1981, 73, 3-46.）等に準じて行うことができる。抗原の免疫原性が低い場合には、アルブミン等の免疫原性を有する巨大分子と結合させ、免疫を行えばよい。また、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた遺伝子組換え型抗体を用いることができる（例えば、Carl, A.K. Borrebaeck, James, W. Larrick, *THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES*, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990参照）。

- 7 -

具体的には、ハイブリドーマのmRNAから逆転写酵素を用いて抗体の可変領域（V領域）のcDNAを合成する。目的とする抗体のV領域をコードするDNAが得られれば、これを所望の抗体定常領域（C領域）をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターへ組み込む。または、抗体のV領域をコードするDNAを、抗体C領域のDNAを含む発現ベクターへ組み込んでよい。発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる。

本発明の抗PepT抗体の認識するPepT分子上のエпитープは特定のものに限定されず、PepT分子上に存在するエпитープならばどのエпитープを認識してもよいが、PepTは12回膜貫通型タンパク質なので、細胞外領域に存在するエпитープを認識するのが好ましい。

本発明では、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ（Chimeric）抗体、ヒト型化（Humanized）抗体などを使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウス抗体の重鎖、軽鎖の可変領域とヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常領域からなる抗体であり、マウス抗体の可変領域をコードするDNAをヒト抗体の定常領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得ることができる。

ヒト型化抗体は、再構成（reshaped）ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域（CDR; complementarity determining region）をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている。具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域（framework region; FR）を連結するように設計したDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する。得られたDNAをヒト抗体定常領域をコードするDNA

- 8 -

と連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる（欧州特許出願公開番号EP 239400、国際特許出願公開番号WO 96/02576参照）。CDRを介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい（Sato, K. et al., Cancer Res, 1993, 53, 851-856.）。

また、ヒト抗体の取得方法も知られている。例えば、ヒトリンパ球をin vitroで所望の抗原または所望の抗原を発現する細胞で感作し、感作リンパ球をヒトミエロマ細胞、例えばU266と融合させ、抗原への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる（特公平1-59878参照）。また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を所望の抗原で免疫することで所望のヒト抗体を取得することができる（国際特許出願公開番号WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735参照）。さらに、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体（scFv）としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択することができる。選択されたファージの遺伝子を解析すれば、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするDNA配列を決定することができる。抗原に結合するscFvのDNA配列が明らかになれば、当該配列を適当な発現ベクターを作製し、ヒト抗体を取得することができる。これらの方法は既に衆知であり、WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388を参考にすることができる。

抗体遺伝子を一旦単離し、適当な宿主に導入して抗体を作製する場合には、適当な宿主と発現ベクターの組み合わせを使用することができる。真核細胞を宿主として使用する場合、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を用いることができる。動

- 9 -

物細胞としては、(1) 哺乳類細胞、例えば、CHO, COS, ミエローマ、BHK (baby hamster kidney), HeLa, Vero, (2) 両生類細胞、例えば、アフリカツメガエル卵母細胞、あるいは(3) 昆虫細胞、例えば、sf9, sf21, Tn5などが知られている。植物細胞としては、ニコティアナ (*Nicotiana*) 属、例えばニコティアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) 由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、例えばサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、糸状菌、例えば、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、例えばアスベスギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) などが知られている。原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (*E. coli*)、枯草菌が知られている。これらの細胞に、目的とする抗体遺伝子を形質転換により導入し、形質転換された細胞をin vitroで培養することにより抗体が得られる。

また、抗体はPepTに結合することができれば、抗体の断片又はその修飾物であってもよい。例えば、抗体の断片としては、Fab、F(ab')₂、Fv、またはH鎖若しくはL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv(scFv)、ダイアボディー (Diabody) などが挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えばババイン、ペプシンなどで処理し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる(例えば、Co, M. S. et al., *J. Immunol.*, 1994, 152, 2968-2976., Better, M. & Horwitz, A. H., *Methods in Enzymology*, 1989, 178, 476-496, Academic Press, Inc., Plueckthun, A. & Skerra, A., *Methods in Enzymology*, 1989, 178, 476-496, Academic Press, Inc., Lamoyi, E., *Methods in Enzymology*, 1989, 121, 663-669., Bird, R. E. et al., *TIBTECH*, 1991, 9, 132-137. 参照)。

scFvは、抗体のH鎖V領域とL鎖V領域とを連結することにより得られる。このscFvにおいて、H鎖V領域とL鎖V領域は、リンカー、好ましくはペプチドリリンカーを介して連結される(Huston, J. S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1988, 85, 5879-5883.)。scFvにおけるH鎖V領域およびL鎖V領域は、本明細書に抗体として記

- 10 -

載されたもののいずれの由来であってもよい。V領域を連結するペプチドリンカーとしては、例えば12-19残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。scFvをコードするDNAは、前記抗体のH鎖またはH鎖V領域をコードするDNA、およびL鎖またはL鎖V領域をコードするDNAのうち、それらの配列のうちの全部又は所望のアミノ酸配列をコードするDNA部分を鋳型とし、その両端を規定するプライマー対を用いてPCR法により増幅し、次いで、さらにペプチドリンカー部分をコードするDNA、およびその両端が各々H鎖、L鎖と連結されるように規定するプライマー対を組み合わせることで増幅することにより得られる。また、一旦scFvをコードするDNAが作製されると、それらを含む発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができ、また、その宿主を用いることにより、常法に従ってscFvを得ることができる。これらの抗体断片は、前記と同様にして遺伝子を取得し発現させ、宿主により産生させることができる。抗体の修飾物として、ポリエチレングリコール (PEG) 等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。又、抗体に放射性同位元素、化学療法剤、細菌由来トキシン等の細胞傷害性物質などを結合することも可能であり、特に放射性標識抗体は有用である。このような抗体修飾物は、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。なお、抗体の修飾方法はこの分野においてすでに確立されている。本発明における「抗体」にはこれらの抗体も包含される。

さらに、本発明で使用する抗体は二重特異性抗体(bispecific antibody)であってもよい。二重特異性抗体は、例えば、PepT分子上の異なるエピトープを認識する抗原結合部位を有する二重特性抗体であってもよいし、一方の抗原結合部位がPepTを認識し、他方の抗原結合部位が放射性物質、化学療法剤、細胞由来トキシン等の細胞障害性物質を認識してもよい。この場合、PepTを発現している細胞に直接細胞障害性物質を作用させ腫瘍細胞に特異的に障害を与え、腫瘍細胞の増殖を抑制することが可能である。二重特異性抗体は2種類の抗体のHL対を結合させて作製することもできるし、異なるモノクローナル抗体を産生するハイブリドー

- 11 -

マを融合させて、二重特異性抗体産生融合細胞を作製し、得ることもできる。さらに、遺伝子工学的手法により二重特異性抗体を作製することも可能である。

前記のように発現、産生された抗体は、通常のタンパク質の精製で使用されている公知の方法により精製することができる。例えば、プロテインAカラムなどのアフィニティークラム、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせることにより、抗体を分離、精製することができる(Antibodies A Laboratory Manual. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。

抗体の抗原結合活性(Antibodies A Laboratory Manual. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)の測定には公知の手段を使用することができる。例えば、ELISA (酵素結合免疫吸着検定法)、EIA (酵素免疫測定法)、RIA (放射免疫測定法) あるいは蛍光免疫法などを用いることができる。

また、本発明の細胞増殖抑制剤に含有されるPepTに結合する抗体としては特に限定されないが、好ましいのはプロトン駆動によりペプチドを細胞内に取り込む(トランスポート活性を有する) PepTに結合する抗体であり、さらに好ましいのはPepT1またはPepT2に結合する抗体であり、特に好ましいのはPepT1に結合する抗体である。

PepT1およびPepT2の塩基配列、アミノ酸配列は既に知られている(ヒトPepT1: GenBank XM_007063、J.Biol.Chem., 1995, 270(12), 6456-6463.、ヒトPepT2: GenBank XM_002922、Biochim.Biophys.Acta., 1995, 1235;461-466.、マウスPepT1: GenBank AF205540、Biochim. Biophys. Acta., 2000, 1492, 145-154.、マウスPepT2: GenBank NM_021301、Biochim. Biophys. Res. Commun., 2000, 276, 734-741.)。

また、本発明のpepTに結合する抗体は、pepTの細胞外領域に特異的に結合する抗体であることが好ましい。本発明において、細胞外領域に対する特異的な結合とは、PepTの細胞外領域とそれ以外の領域を免疫学的に識別しうることを言う。

- 12 -

より具体的には、細胞外領域には結合するが、細胞内領域等や膜貫通ドメインとは結合しない抗体を、PepTの細胞外領域に特異的に結合する抗体とすることができ、本発明において、好ましいPepTは、ヒトPepTである。ヒトPepTは、ヒトに由来のみならず、ヒトPepTをバキュロウイルス発現系で発現させて得ることができる組み換え体であることもできる。細胞外領域に特異的に結合する抗体を取得する際に用いられる免疫原としては、例えば、細胞膜やウイルス膜などの膜上に発現させたPepTや、PepTの細胞外領域を含む断片などを挙げることもできる。又、免疫原として用いられるPepTは、トランスポーター活性の有無に限定されず、トランスポート活性を有するPepT、トランスポート活性のないPepTのどちらでも用いることが可能である。トランスポート活性を有するPepTを免疫原として用いる場合には、例えば、細胞膜やウイルス膜などの膜上に発現させたPepTを用いることができる(例えば、Ba/F3細胞膜上やバキュロウイルス膜上に発現させたPepT)。PepTはグリシルサルコシン等を基質として取り込むことが知られているので、例えば、 $[^{14}\text{C}]$ グリシルサルコシンなどを、膜上に発現したPepTに接触させ、 $[^{14}\text{C}]$ グリシルサルコシンの取り込みを観察することによって、トランスポート活性の有無を判断することが可能である。

増殖抑制の標的とする細胞は特に限定はされないが、好ましいのは膵臓癌、肝臓癌、肺癌、食道癌、乳癌、大腸癌などの癌細胞であり、特に好ましいのは膵臓癌細胞である。よって、本発明の細胞増殖阻害剤は、細胞増殖に起因する疾患、特に膵臓癌などの癌の治療、予防を目的として使用できる。

本発明の細胞増殖阻害剤は、経口、非経口投与のいずれでも可能であるが、好ましくは非経口投与であり、具体的には、注射剤型、経鼻投与剤型、経肺投与剤型、経皮投与型などが挙げられる。注射剤型の例としては、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などにより全身または局部的に投与することができる。また、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。投与量としては、例えば、一回につき体重1kgあたり0.0001mgから1000mgの範囲で

- 13 -

選ぶことが可能である。あるいは、例えば、患者あたり0.001~100000mg/bodyの範囲で投与量を選ぶことができる。しかしながら、本発明の治療薬はこれらの投与量に制限されるものではない。

本発明の細胞増殖阻害剤は、常法に従って製剤化することができ（例えば、Remington's Pharmaceutical Science, latest edition, Mark Publishing Company, Easton, U.S.A）、医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。例えば界面活性剤、賦形剤、着色料、着香料、保存料、安定剤、緩衝剤、懸濁剤、等張化剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤等が挙げられるが、これらに制限されず、その他常用の担体を適宜使用することができる。具体的には、軽質無水ケイ酸、乳糖、結晶セルロース、マンニトール、デンプン、カルメロースカルシウム、カルメロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルアセタールジエチルアミノアセテート、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、中鎖脂肪酸トリグリセライド、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、白糖、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩類等を挙げることができる。

また、本発明は、PepTに結合する抗体を投与することを特徴とする、細胞に障害を引き起こす方法を提供する。該PepTに結合する抗体は、本発明の細胞増殖抑制剤に含有されるPepTに結合する抗体として上述している。本発明の方法は、細胞増殖に起因する疾患、特に膵臓癌などの癌の治療、予防を目的として使用できる。

図面の簡単な説明

図1は、pepT1高発現膵臓癌細胞株AsPC-1およびpepT2高発現膵臓癌細胞株BxPC-3に対するPepT1抗体の反応性をFACS解析により調べた結果を示す図である。

図2は、AsPC-1およびBxPC-3細胞におけるPepT1抗体のCDC活性測定の結果を示す図である。上がAsPC-1、下がBxPC-3に対するCDC活性を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例に基づいて本発明を更に具体的に説明する。

1. PepT1抗体の作成

1-1. DEF2A抗体の作成

ヒトPepT1を発現するBa/F3細胞 (Ba/F3-PepT1) をPBSで洗浄し、 4×10^7 細胞/mLになるようにPBSで懸濁した。この細胞液0.25mLをBalb/cマウス (メス) に腹腔内投与することにより免疫を行った。1週間から2週間おきに計19回の免疫を同様にを行い、さらに細胞液を尾静脈内投与することにより20回目の免疫を行った。

このマウスから脾臓細胞を調製し、通常のポリエチレングリコールを使用する方法によってマウスP3U1細胞との細胞融合を行った。細胞を96ウェルプレートに蒔きこみ、ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジンを含む培地 (HAT培地) 中で細胞を培養することにより、ハイブリドーマの選択を行った。細胞融合から9日目に培養上清を回収し、ヒトPepT1を発現する発芽バキュロウイルス (PepT1-BV) を抗原としたELISA (BV-ELISA) によるスクリーニングを行い陽性ウェルを選択した。

BV-ELISAは次のように実施した。すなわち、 $40 \mu\text{g}$ タンパク/mLの濃度になるようにPepT1-BVをPBSで希釈し、それを $100 \mu\text{L}$ /ウェルでELISA用96ウェルプレート (Maxisorp : Nunc社) に分注した。このプレートを 4°C で一晩以上放置することによってPepT1-BVをプレートに吸着させた。このプレートを用い、通常の方法に従ってELISAを行った。

陽性ウェルであると判定されたウェルから限界希釈法によりハイブリドーマのクローン化を行った。クローン化された細胞の培養上清につき再度PepT1-BVを用いたBV-ELISAを行うことにより、陽性クローンDEF2Aを同定した。

DEF2Aを拡大培養し、その培養上清を用いてヒト膵臓癌細胞株AsPC-1に対する反応性をFACS解析により調べたところ、DEF2Aが産生する抗体はAsPC-1と特異的に反

- 15 -

応することが明らかとなった（図1）。

1-2. BPT01-13抗体の作成

PBSに懸濁した1mgのタンパク量に相当するpepT1-BVと200ngの百日咳毒素をgp64トランスジェニックマウス（特願2002-180351）に皮下注射する事により初回免疫を行った。以後の免疫は同様に調製した500 μ gタンパク量相当のpepT1-BV（ただし百日咳毒素は含まない）を皮下注射することにより行った。最終免疫は250 μ gタンパク量相当のpepT1-BV（ヒトPepT1を発現するバキュロウイルス：特願2002-180351）を尾静注する事により行った。このマウスから脾臓細胞を調製し、通常のポリエチレングリコールを使用する方法によってマウスP3U1細胞との細胞融合を行った。

スクリーニングはBaF/3-pepT1細胞を用いたFACSで行った。更にBaF/3-pepT2細胞を用いたFACSによりpepT1特異的に結合するモノクローナル抗体「BPT01-13」を樹立した。最終的にAsPC-1とBxPC-3のFACSを行いガン細胞上のpepT1特異的な結合を確認した（図1）。

2. PepT1 抗体のCDC 活性測定

PepT1 発現陽性の脾臓癌細胞株(AsPC-1 細胞)および陰性の脾臓癌細胞株(BxPC-3 細胞)を用いて PepT1 抗体の CDC 活性を測定した。

AsPC-1 細胞は20 % FBS- RPMI培地、BxPC-3 細胞は10 % FBS- RPMI 培地で培養した。細胞を96 well plate にまいて(1E4個/ well) 2日間培養後、 ^{51}Cr (Amersham pharmacia, CJS4) を5 μCi / well 添加し、1時間培養して細胞を標識した。細胞を300 μL / well の HAV buffer で洗浄し、0.2, 2, 20 $\mu\text{g/mL}$ のPepT 抗体(BPT01-13 または DEF2A) を100 μL / well 加え、氷上で15分間静置した。さらに100 % の幼齢ウサギ補体 (CEDARLANE, CL3441, Lot.6213) を100 μL / well 添加し、37°C で90分間静置した。遠心(1,000 rpm, 5 min, 4°C) 後、上清を100

- 16 -

μL/ well 回収してγカウンター (Packard Instrument Company, COBRAIIIAUTO-GAMMA, MODEL505) で放射活性を測定した。下式により、CDC活性 (%) を求めた。

$$\text{CDC 活性 (\%)} = (A-C) \times 100 / (B-C)$$

A は各 well の放射活性、B は補体の代わりに2% NP-40 水溶液 (Nonidet P-40, ナカライテスク, 252-23, Lot.M7M7690) を 100 μL 加えた well について放射活性の平均値、C は抗体および補体を添加せず、HAV buffer を 200 μL 加えた well について放射活性の平均値を示す。試験は triplicate で行い、CDC 活性値および標準誤差を算出した (図2)。

産業上の利用の可能性

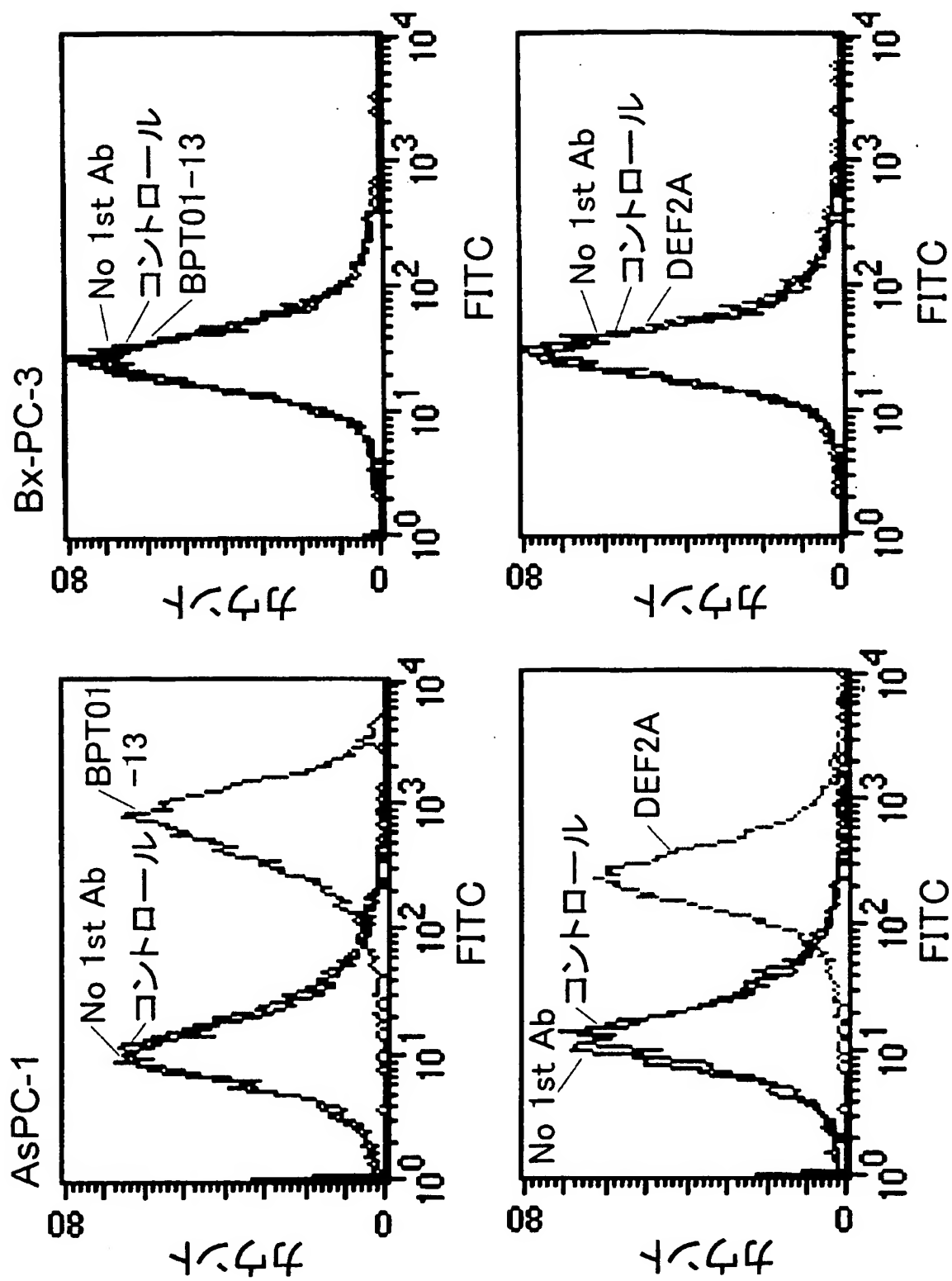
本発明者らによって、PepTに結合する抗体が細胞傷害活性を有し、細胞増殖を抑制することが見出された。これらの抗体は、細胞増殖抑制剤として、例えば癌の治療や予防への利用が可能である。

- 17 -

請求の範囲

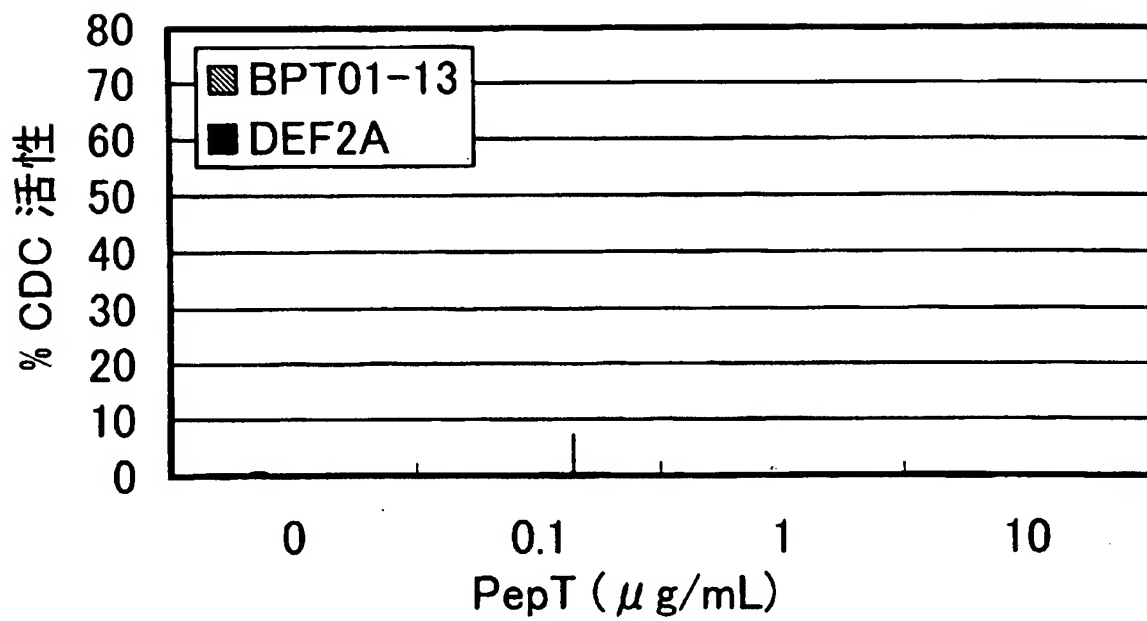
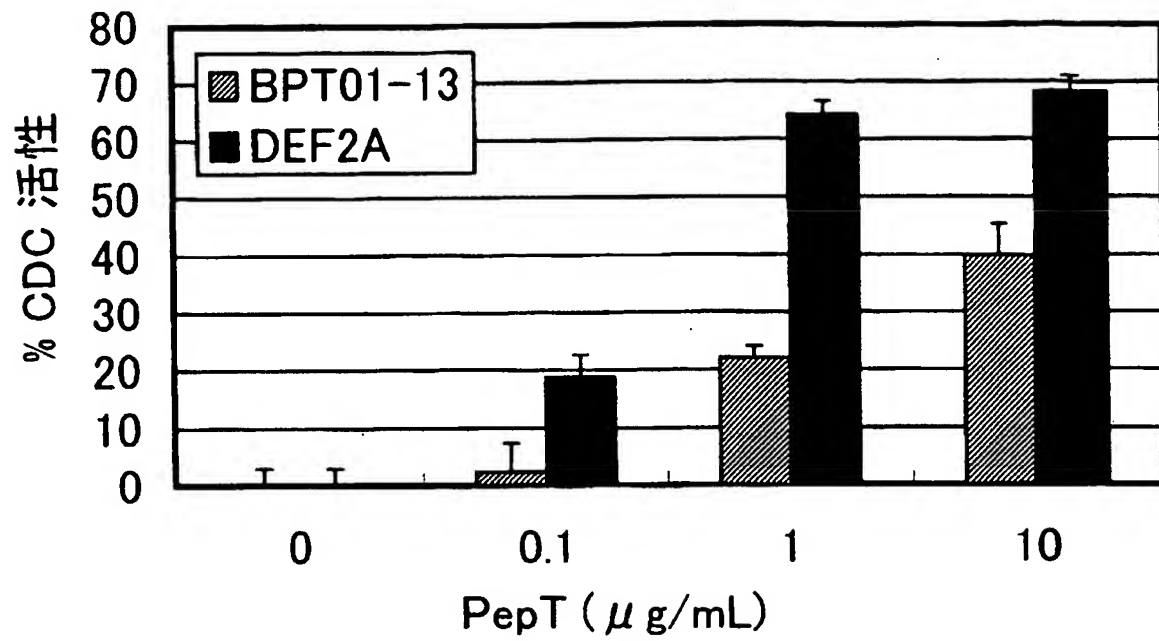
1. PepTに結合する抗体を有効成分として含有する細胞増殖抑制剤。
2. PepTに結合する抗体が細胞障害活性を有する抗体である、請求項 1 に記載の細胞増殖抑制剤。
3. 細胞傷害活性が抗体依存性細胞性細胞傷害活性（ADCC活性）である、請求項 2 に記載の細胞増殖抑制剤。
4. 細胞傷害活性が補体依存性細胞傷害活性（CDC活性）である、請求項 2 に記載の細胞増殖抑制剤。
5. PepTがPepT1である、請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の細胞増殖抑制剤。
6. 癌細胞の増殖を抑制する、請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載の細胞増殖抑制剤。
7. 癌細胞が膵臓癌である、請求項 6 に記載の細胞増殖抑制剤。
8. PepTに結合する抗体を投与することを特徴とする、細胞に障害を引き起こす方法。
9. PepTに結合し、かつ細胞障害活性を有する抗体。
10. 細胞傷害活性が抗体依存性細胞性細胞傷害活性（ADCC活性）である、請求項 9 に記載の抗体。
11. 細胞傷害活性が補体依存性細胞傷害活性（CDC活性）である、請求項 9 に記載の抗体。
12. PepTの細胞外領域に特異的に結合する、請求項 9 に記載の抗体。
13. PepTがヒト由来である。請求項 9 に記載の抗体。
14. PepTがPepT1である、請求項 9 ～ 13 のいずれかに記載の抗体。

図 1



2 / 2

図 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/12708

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K39/395, A61P35/00, 43/00, C07K16/18, C12P21/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K39/395, A61P35/00, 43/00, C07K16/18, C12P21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2003 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), BIOSIS (STN), REGISTRY (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	SUN, D. et al., Drug inhibition of Gly-Sar uptake and hPepT1 localization using hPepT1-GFP fusion protein, AAPS PharmaSci[online], 11 January, 2001 (11.01.01), Vol.3, No.1, E2, full text Retrieved from the Internet: <URL:http://www.aapspharmsci.org/view.asp?path=ps0301%ps030102%ps030102.xml&pdf=yes>	9-11,13,14 1-7
X A	SAI, Yoshimichi et al., Immunolocalization and pharmacological relevance of oligopeptide transporter PepT1 in intestinal absorption of β -lactam antibiotics, FEBS Letters, 1996, Vol.392, No.1, pages 25 to 29, full text	9-11,13,14 1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
20 February, 2003 (20.02.03)

Date of mailing of the international search report
11 March, 2003 (11.03.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/12708

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MRSNY, Randall J. et al., Oligopeptide transporters as putative therapeutic targets for cancer cells, Pharmaceutical Research, 1998, Vol.15, No.6, pages 816 to 818, full text	1-7,9-14
A	GONZALEZ, Deborah E. et al., An oligopeptide transporter is expressed at high levels in the pancreatic carcinoma cell lines AsPc-1 and Capan-2, CANCER RESEARCH, 1998, Vol.58, No.3, pages 519 to 525, full text	1-7,9-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/12708

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 8

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 8 pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

It is recognized that the matter common to the inventions as set forth in claims 1 to 7 of the present application and the inventions as set forth in claims 9 to 14 resides in "an antibody binding to PepT". However, such an antibody had been publicly known as reported in the following document. Thus, this constitution cannot be regarded as a novel matter. Therefore, it cannot be considered as the major part of the invention.

Also, it cannot be recognized that these groups of inventions have a common technical problem which had remained unsolved until the application.

Such being the case, the inventions as set forth in claims 9 to 14 and the inventions as set forth in claims 1 to 7 (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:**Remark on Protest**☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/12708

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

of the present case are not considered as relating to a group of inventions
so linked as to form a single general inventive concept.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ A61K39/395, A61P35/00, 43/00, C07K16/18, C12P21/08		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ A61K39/395, A61P35/00, 43/00, C07K16/18, C12P21/08		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2003年 日本国登録実用新案公報 1994-2003年 日本国実用新案登録公報 1996-2003年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
CAPLUS (STN) BIOSIS (STN) REGISTRY (STN) EMBASE (STN) MEDLINE (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	SUN, D. <i>et al</i> , Drug inhibition of Gly-Sar uptake and hPepT1 localization using hPepT1-GFP fusion protein, AAPS PharmaSci[online], 2001.01.11, Vol.3, No.1, E2, 全文, Retrieved from the Internet: <URL:http://www.aapspharmsci.org/view.asp?path=ps0301&ps030102&ps030102.xml&pdf=yes>	9-11, 13, 14 1-7
X A	SAI, Yoshimichi <i>et al</i> , Immunolocalization and pharmacological relevance of oligopeptide transporter PepT1 in intestinal absorption of β -lactam antibiotics, FEBS Letters, 1996, Vol.392, No.1, pp25-29, 全文	9-11, 13, 14 1-7
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	20.02.03	国際調査報告の発送日
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JIP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 中木 亜希 電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	MRSNY, Randall J. <i>et al</i> , Oligopeptide transporters as putative therapeutic targets for cancer cells, Pharmaceutical Research, 1998, Vol.15, No.6, pp816-818, 全文	1-7, 9-14
A	GONZALEZ, Deborah E. <i>et al</i> , An oligopeptide transporter is expressed at high levels in the pancreatic carcinoma cell lines AsPc-1 and Capan-2, CANCER RESERCH, 1998, Vol.58, No.3, pp519-525, 全文	1-7, 9-14

第1欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 8 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲8は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

本願の請求の範囲1-7に係る発明と、請求の範囲9-14に係る発明の共通部は「PepTに結合する抗体」とであると認められるが、以下文献に記載のとおり、当該抗体は公知であるので、当該構成は新規な事項とは認められず、発明の主要部と見ることができない。

また、両者がこの出願時まで未解決であった技術上の共通の課題を持つものとも認められない。

したがって、本願の請求の範囲9-14に係る発明はいずれも請求の範囲1-7に記載の発明と単一の一般的発明概念を形成するように関連している一群の発明とは認められない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。